

Translation

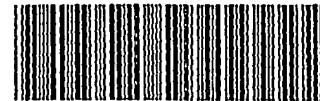
PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

PCT Application  
PCT/JP2003/001917



Applicant's or agent's file reference PH-1733-PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP03/01917	International filing date (day/month/year) 21 February 2003 (21.02.03)	Priority date (day/month/year) 29 March 2002 (29.03.02)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/29, 9/88, 15/60, 5/14, A01H 5/00		
Applicant KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.
- ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
- These annexes consist of a total of 3 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 02 April 2003 (02.04.03)	Date of completion of this report 06 August 2003 (06.08.2003)
Name and mailing address of the IPEA/IP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP03/01917

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages \_\_\_\_\_ 1-50,53 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_ 51,52 \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_ 23 July 2003 (23.07.2003)
- ☒ the claims:  
pages \_\_\_\_\_ 2-4,7 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_ 1,5,6,8 \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_ 18 June 2003 (18.06.2003)
- ☒ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_ 1-34 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_ 1-56 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP03/01917

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-8	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

Document 1: WO, 1-85970, A2 (Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College), 15 November, 2001 (15.11.01), & EP, 1280928, A2, & AU, 200161358, A

Document 2: "A Naturally Occurring Point Mutation Confers Broad Range Tolerance to Herbicides That Target Acetolactate Synthase," (P. Bernasconi, et al.), J. Biol. Chem., 1995, Vol. 270, No. 29, pages 17381-17385

Document 3: "Intragenic Recombination in the CSR1 Locus of Arabidopsis," (G. Mourad, et al.), Mol. Gen. Genet., 1994, Vol. 243, No. 2, pages 178-184

Document 4: "Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy Acids: Acetolactate Synthases and Acetohydroxyacid Synthases, (David Chipman, et al.), Biochim. Biophys. Acta, 1998, Vol. 1385, pages 401-419

Document 5: "Role of Tryptophanyl Residues in Tobacco Acetolactate Synthase," (C.K. Chong, et al.), Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999, Vol. 259, No. 1, pages 136-140

Document 6: "Amino Acid Residues Conferring Herbicide Tolerance in Tobacco Acetolactate Synthase," (C.K. Chong, et. al.), Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, Vol. 279, No. 2, pages 462-467

Document 7: "The Molecular Basis of Sulfonylurea Herbicide Resistance in Tobacco," (Kathleen Y. Lee, et al.), The EMBO J., 1988, Vol. 7, No. 5, pages 1241-1248

**Claims 1-8**

The subject matters of claims 1-8 do not appear to involve an inventive step in view of documents 1-7 cited in the ISR.

Document 1 describes *Oryza sativa*-herbicide tolerant ALSs (1) identical with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 of the present application except 171<sup>st</sup> His and 172<sup>nd</sup> Ser, (2) identical with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:4 of the present application except 171<sup>st</sup> His (identical also in the 548<sup>th</sup> mutation of the invention of the present application), (3) identical with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:6 of the present application except 171<sup>st</sup> His (identical also in the 627<sup>th</sup> mutation of the invention of the present application), and (4) identical with the amino acid sequence of SEQ ID NO:8 of the present application except 171<sup>st</sup> His (identical also in the 548<sup>th</sup> and 627<sup>th</sup> mutations of the invention of the present application).

Document 2 describes to the effect that a point mutant of an ALS acquires tolerance to sulfonylurea-based herbicides, imidazolinone-based herbicides, PC herbicides and triazolopyrimidine-based herbicides.

Document 3 describes (1) to the effect that a point mutant of *Arabidopsis thaliana* ALS acquires herbicide tolerance, (2) to the effect that the resistance to PC-based herbicides can also be conferred because of a point-mutated site, and (3) to the effect that in both herbicide-tolerant *Arctium lappa* ALS and *Zea mays* ALS, Trp552 is mutated into Leu.

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of : V

Document 4 describes an alignment diagram of ALS sequences of various species, and shows active sites and sites of mutation to confer SU herbicide tolerance. The document also describes to the effect that the mutations of P173S of *Brassica napus*, P197S, S653N, M124I and R199E of *A. thaliana* and P196Q of *Nicotiana tabacum* confer herbicide tolerance.

Document 5 describes to the effect that in *Nicotiana tabacum* ALS, a mutation from Trp573 into Phe could confer herbicide tolerance.

Document 6 describes to the effect that in *Nicotiana tabacum* ALS, point mutations of Ala121, Pro187 and Ser652 could confer herbicide tolerance.

Document 7 describes to the effect that in a herbicide-tolerant mutant of *Nicotiana tabacum* ALS, Pro196 had been mutated into Gln and Ala, while Trp573 had been mutated into Leu.

As described in document 4, as of the priority date of the present application, the amino acid sequences of ALSs of various species, highly preservative sequence sites, active sites and sites of mutation to confer herbicide tolerance are publicly known. Furthermore, from documents 1-7, it is publicly known that if an ALS is point-mutated, it can have herbicide tolerance and acquire PC-based herbicide tolerance. From documents 2-7, it is publicly known that if Pro, Ser, Trp, Ala, Met or Arg is substituted in an amino acid sequence encoding an ALS, herbicide tolerance can be acquired. So, a person skilled in the art could have easily conceived of (1) mutating a site known to confer herbicide tolerance for further enhancing herbicide tolerance in the herbicide-tolerant mutants of *Oryza sativa* ALS described in document 1, and (2) mutating the portion of Pro, Ser, Trp, Ala, Met or Arg as the target of point mutation.

Moreover, as of the priority date of the present application, it is considered to have been well-known techniques in this field, (1) to integrate a publicly known DNA into a vector, (2) to integrate the vector into a host cell for transformation, and (3) to prepare an antibody against a peptide having a known sequence. So, it would have been easy to prepare a vector of a mutated ALS gene of *Oryza saliva*, and to transform the said vector into a host cell.

The effects achieved by the subject matters of claims 1-8 of the present application are considered to be predictable.

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 22 AUG 2003

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 PH-1733-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO3/01917	国際出願日 (日.月.年) 21.02.03	優先日 (日.月.年) 29.03.02
国際特許分類(IPC) Int. Cl. C12N15/29, C12N9/88, C12N15/60, C12N5/14, A01H5/00		
出願人(氏名又は名称) クミアイ化学工業株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。  
☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で 3 ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
  - ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - ☐ 優先権
  - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - ☐ 発明の単一性の欠如
  - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - ☐ ある種の引用文献
  - ☐ 国際出願の不備
  - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 02.04.03	国際予備審査報告を作成した日 06.08.03	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 鈴木 美葉子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 9839

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

- ☒ 明細書 第 1-50, 53 ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 51, 52 ページ、 23.07.03 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 請求の範囲 第 2-4, 7 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 1, 5, 6, 8 項、 18.06.03 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 図面 第 1-34 ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☒ 明細書の配列表の部分 第 1-56 ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出された磁気ディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された磁気ディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列と磁気ディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-8	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-8	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-8	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

- 文献1: WO 01/85970 A2(UNIV LOUISIANA STATE & AGRIC & MECH COLL) 2001.11.15  
& EP 1280928 A2 & AU 200161358 A
- 文献2: Bernasconi P, et. al., A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase., J. Biol. Chem. (1995) Vol. 270, No. 29, p. 17381-17385
- 文献3: Mourad G, et. al., Intragenic recombination in the CSRI locus of Arabidopsis., Mol. Gen. Genet. (1994), Vol. 243, No. 2, p. 178-184
- 文献4: David CHIPMAN, et. al., Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases., Biochim. Biophys. Acta(1998), Vol. 1385, p. 401-419
- 文献5: Chong CK, et. al., Role of tryptophanyl residues in tobacco acetolactate synthase., Biochem Biophys Res Commun. (1999), Vol. 259, No. 1, p. 136-140
- 文献6: Chong CK, et. al., Amino acid residues conferring herbicide tolerance in tobacco acetolactate synthase., Biochem Biophys Res Commun. (2000), Vol. 279, No. 2, p. 462-467
- 文献7: Kathleen Y. LEE, et. al., The molecular basis of sulfonylurea herbicide resistance in tobacco., The EMBO J. (1988), Vol. 7, No. 5, p. 1241-1248

## 【請求の範囲1-8について】

請求の範囲1-8に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1-7により進歩性を有さない。

文献1には、本願配列番号2のアミノ酸配列と171番目 His と172番目の Ser 以外は全て同一、本願配列番号4のアミノ酸配列と171番目 His 以外は全て同一（本願発明の548番目の変異も同一）、本願配列番号6のアミノ酸配列と171番目 His 以外は全て同一（本願発明の627番目の変異も同一）、本願配列番号8のアミノ酸配列と171番目の His 以外は全て同一（本願発明の548、627番目の変異も同一）のイネ除草剤耐性ALSが記載されている。

文献2には、ALSの点変異体がスルホニルウレア系除草剤、イミダゾリノン系除草剤、PC除草剤、トリアゾピリミジン系除草剤耐性を得る旨、文献3には、シロイヌナズナALSの点変異体が除草剤耐性を得る旨、点変異部位によって、PC系除草剤抵抗性も有する旨、除草剤耐性のゴボウALSとトウモロコシALSの両者はTrp552がLeuに変異していた旨、記載されている。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

## 第 V. 欄の続き

文献4には、様々な種の ALS 配列のアライメント図が記載され、活性部位やSU除草剤耐性を与える変異の部位も表示され、*Brassica napus* の P173S、*A.thaliana* の P197S、S653N、M124I、R199E、*Nicotiana tabacum* の P196Q の変異が除草剤耐性を与える旨も記載している。

文献5には、タバコ ALS において、Trp573 を Phe に変異することによって除草剤耐性が得られた旨、記載されている。

文献6には、タバコ ALS において、Ala121、Pro187、Ser652 の点変異を行うことにより除草剤耐性が得られた旨、記載されている。

文献7には、除草剤耐性変異体タバコ ALS において、Pro 196 が Gln と Ala に、Trp 573 が Leu に変異していた旨、記載されている。

文献4に記載されるように、本願優先日当時、様々な種の ALS のアミノ酸配列や保存性の高い配列部位、活性部位、除草剤耐性を与える変異の部位が公知であり、また、文献1-7より、ALS に点変異を与えることにより除草剤耐性を有すること、PC系除草剤耐性を得ること、文献2-7には、ALS をコードするアミノ酸配列において、Pro、Ser、Trp、Ala、Met、Arg を置換することによって除草剤耐性を得る旨公知であることから、文献1に記載されるイネ ALS 除草剤耐性変異体において、更なる除草剤耐性を高めるために、除草剤耐性を与えることが知られる部位に変異を入れること、また、その点変異をするターゲットとして、Pro、Ser、Trp、Ala、Met、Arg 部分を変異させることは容易に想到しうるものであると認められる。

更に、本願優先日当時、公知のDNAをベクターに組み込むこと、そのベクターを宿主細胞に組み込んで形質転換すること、配列が知られたペプチドに対する抗体を作成することは、当該分野における周知技術であると認められるから、イネの変異 ALS 遺伝子のベクターを作製すること、該ベクターを宿主細胞に形質転換することは、容易になし得るものであると認める。

また、本願請求の範囲1-8に係る発明の効果も予測し得る程度のものであると認められる。



パク質のRS比は予想RS比よりも有意に大きくなっていた（実際のRS比と予想RS比の比が1よりも明確に大きくなる）。このことから、P171H/R172S変異型ALSタンパク質は、pyrithiobac-sodiumに対して、1点変異型遺伝子の抵抗性の度合いから予想されるよりも強い抵抗性を示すことが判明した。

次に、pyriminobacによる阻害活性（表 1 1）からは次のことが明らかになった。1点変異型遺伝子（P171H、R172S、W548L及びS627I）がコードする変異型ALSタンパク質の中では、W548L変異型ALSタンパク質がpyriminobacに対して最も強い抵抗性を示した（RS比4500）。S627I変異型ALSタンパク質も強い抵抗性を与えたが（RS比2800）、P171H変異型ALSタンパク質の抵抗性の度合いは低く（RS比5）、R172S変異型ALSタンパク質は野生型ALSタンパク質と同等の抵抗性しか示さなかった（RS比1.2）。このことから、ALSタンパク質におけるP171H変異、W548L変異及びS627I変異は、pyriminobacに対する抵抗性を増強させるのに有効な変異であることが明らかとなった。また、ALSタンパク質におけるR172S変異は、サイレント変異であることが明らかとなった。

2点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質で最も強い抵抗性を与えたのは、P171H/W548L変異型ALSタンパク質であり（100  $\mu$ Mで11%の阻害、RS比は>13000）、続いてP171H/S627I変異型ALSタンパク質であった（100  $\mu$ Mで21%の阻害、RS比は>13000）。これらP171H/W548L変異型ALSタンパク質及びP171H/S627I変異型ALSタンパク質について、予想RS比と実際のRS比とを比較した結果、1点変異型遺伝子の抵抗性の度合いから予想されるよりも強い抵抗性を示すかどうかを明確にすることはできなかった。

次に、chlorsulfuronによる阻害活性（表 1 2）からは次のことが明らかになった。1点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質（P171H、R172S、W548L及びS627I）の中では、W548L変異型ALSタンパク質がchlorsulfuronに対して最も強い抵抗性を示した（RS比760）。P171H変異型ALSタンパク質も比較的強い抵抗性を示した（RS比85）が、S627I変異型ALSタンパク質の抵抗性の度合いは低く（RS比2.4）、R172S変異型ALSタンパク質は野生型ALSタンパク質と同等の抵抗性しか示さなかった（RS比0.85）。このことから、ALSタンパク質におけるP171H変異及びW548L変異は、chlorsulfuronに対する抵抗性を増強させるのに有効な変異であるこ

とが明らかとなった。また、ALSタンパク質におけるR172S変異は、サイレント変異であることが明らかとなった。

2点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質で最も強い抵抗性を与えたのはP171H/W548L変異型ALSタンパク質であり（100  $\mu$ Mで16%の阻害、RS比は>7700）、続いてP171H/S627I変異型ALSタンパク質であった（RS比760）。表9に示したb ispyribac-sodiumによる阻害活性データとは異なり、chlorsulfuronの場合、P171H/R172S変異型ALSタンパク質の抵抗性の度合い（RS比420）はP171H変異型ALSタンパク質よりも高い度合いで抵抗性を示しており、単独ではサイレント変異であるR172S変異がP171H変異型ALSタンパク質の抵抗性の度合いを高めることが判明した。また、P171H/W548L/S627I変異型ALSタンパク質も強い抵抗性を与えた（50  $\mu$ Mで30%の阻害、RS比は>38000）。

P171H/R172S変異型ALSタンパク質及びP171H/S627I変異型ALSタンパク質について、予想RS比と実際のRS比と比較したところ、ともに実際のRS比は予想RS比よりも有意に大きくなっていた。このことから、P171H/R172S変異型ALSタンパク質及びP171H/S627I変異型ALSタンパク質は、chlorsulfuronに対して、1点変異型遺伝子の抵抗性の度合いから予想されるよりも強い抵抗性を示すことが判明した。

次に、Imzaquinによる阻害活性データ（表13）からは次のことが明らかとなった。1点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質（P171H、R172S、W548L及びS627I）の中では、W548L変異型ALSタンパク質がimazaquinに対して最も強い抵抗性を示した（100  $\mu$ Mで16%、RS比は>45）。S627I変異型ALSタンパク質も抵抗性を示した（RS比6.8）が、P171H変異型ALSタンパク質はほとんど抵抗性を示さなかった（RS比1.5）。R172S変異型ALSタンパク質は、野生型ALSタンパク質と同等の抵抗性しか示さなかった（RS比1.0）。このことから、ALSタンパク質におけるW548L変異及びS627I変異は、imazaquinに対する抵抗性を増強させるのに有効な変異であることが明らかとなった。また、ALSタンパク質におけるP171H変異及びR172S変異は、imazaquinに対してサイレント変異であることが明らかとなった。

2点変異型遺伝子で最も強い抵抗性を与えたのはP171H/W548L変異型ALSタンパク質であり（100  $\mu$ Mで13%の阻害、RS比は>45）、続いてP171H/S627I変異型ALSタンパク質であった（RS比32）。P171H/R172S変異型ALSタンパク質の抵抗性の度合い

## 請求の範囲

1. (補正後) 以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子。
  - (a) 配列番号 2, 4, 6 および 8 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。
  - (b) 配列番号 2, 4, 6 および 8 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列における少なくとも 1 以上のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、ビスピリバックナトリウム除草剤、ピリチオバックナトリウム除草剤及びピリミノバック除草剤に対する抵抗性を有し、アセト乳酸シンターゼ活性を有するタンパク質。
2. 請求項 1 記載の遺伝子によりコードされるアセト乳酸シンターゼタンパク質。
3. 請求項 1 記載の遺伝子を有する組換えベクター。
4. 請求項 3 記載の組換えベクターを有する形質転換体。
5. (補正後) 請求項 1 記載の遺伝子を有し、ビスピリバックナトリウム除草剤、ピリチオバックナトリウム除草剤及びピリミノバック除草剤に対する抵抗性に対する抵抗性を有する植物。
6. (補正後) 請求項 5 記載の植物を、ビスピリバックナトリウム除草剤、ピリチオバックナトリウム除草剤及びピリミノバック除草剤からなる群から選ばれる少なくとも 1 以上の除草剤の存在下で育成することを特徴とする植物育成方法。
7. 請求項 1 記載の遺伝子を選択マーカーとして使用し、該遺伝子を有する形質転換細胞を選択する方法。
8. (追加) 野生型イネ由来アセト乳酸シンターゼにおける 627 番目のセリンに相当するセリンをイソロイシンに変異させたアミノ酸配列を有し、ビスピリバックナトリウム除草剤、ピリチオバックナトリウム除草剤及びピリミノバック除草剤に対する抵抗性を示すタンパク質をコードする遺伝子。